

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Ryoji KATO et al.

Serial Number: Not Yet Assigned

Filed: June 28, 1999

For: **METHOD FOR MEASURING THYROGLOBULIN**

JC525 U.S. PRO
09/340196
06/28/99



CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

June 28, 1999

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 10-199794, filed June 30, 1998

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI
McLELAND & NAUGHTON



Atty. Docket No.: 990701
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
LNM/tmb

Le-Nhung McLeland
Reg. No. 31,541

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC525 U.S. PTO
09/340196
06/28/99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1998年 6月 30日

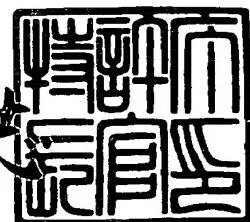
出願番号
Application Number: 平成10年特許願第199794号

出願人
Applicant(s): 和光純薬工業株式会社

1999年 6月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3036390

【書類名】 特許願
【整理番号】 H10P022
【提出日】 平成10年 6月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明の名称】 サイログロブリンの測定方法
【請求項の数】 11
【発明者】
【住所又は居所】 長野県松本市横田2丁目14番3-102号
【氏名】 加藤 亮二
【発明者】
【住所又は居所】 長野県東筑摩郡山形村6783-1
【氏名】 丸山 正幸
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社
大阪研究所内
【氏名】 中村 賢治
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社
大阪研究所内
【氏名】 志水 佳代子
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号 和光純薬工
業株式会社内
【氏名】 里村 慎二
【特許出願人】
【識別番号】 000252300
【氏名又は名称】 和光純薬工業株式会社
【代表者】 田中 幹晃

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイログロブリンの測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サイログロブリンの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリンの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上用いることを特徴とする、サイログロブリンの測定方法。

【請求項2】 測定すべきサイログロブリンが、総サイログロブリン、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリン又は／及びそれ以外の糖鎖構造を有するサイログロブリンである、請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】 特定の糖鎖構造が、レクチン結合性糖鎖構造である、請求項1に記載の測定方法。

【請求項4】 レクチンが、D-ガラクトース-N-アセチル-D-ガラクトサミン結合性レクチン、又はD-マンノース結合性レクチンである、請求項3に記載の測定方法。

【請求項5】 レクチンが、コンカナバリンA、レンズマメレクチン又はヒママメレクチン-120である、請求項3に記載の測定方法。

【請求項6】 特定の糖鎖構造が、腫瘍細胞が産生するサイログロブリンが有する糖鎖構造である、請求項1に記載の測定方法。

【請求項7】 腫瘍細胞が、甲状腺腫瘍由来のものである、請求項6に記載の測定方法。

【請求項8】 サイログロブリンの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリンの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなる、サイログロブリン測定用試薬。

【請求項9】 特定の糖鎖構造を有するサイログロブリン量又はそれ以外の糖鎖構造を有するサイログロブリン量に基づいて鑑別を行うことを特徴とする、甲状腺腫瘍の悪性度鑑別方法。

【請求項10】 サイログロブリン中の、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリン又はそれ以外の糖鎖構造を有するサイログロブリンの割合を、サイログロブリンの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するサイログロブ

リンの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上用いて求める、請求項9に記載の鑑別方法。

【請求項11】サイログロブリンの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリンの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなる、甲状腺腫瘍の悪性度鑑別用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、サイログロブリン（以下、「Tg」と略記する。）の測定方法に関するものであり、特に特定の糖鎖構造を有するTgの測定方法に関する。また、本発明は、特定の糖鎖構造を有するTgの量を求め、この量に基づいて、甲状腺腫瘍悪性度を鑑別する方法に関する。

【0002】

【発明の背景】

Tgは甲状腺組織から分泌され、分子量33万のサブユニットのダイマーで構成される分子量66万の糖タンパク質であり、良性または悪性の甲状腺疾患において、細胞中や血液中の濃度が上昇することが知られている。このため血液中のTg量の測定は甲状腺癌手術後の経過観察に使用されている。しかしながら、血液中のTg量で、甲状腺腫瘍の良性、悪性を鑑別することはできない。

【0003】

そのため、甲状腺腫瘍の悪性度の鑑別のためには、超音波診断、穿刺吸引細胞診がおこなわれている。しかし、超音波診断では卓越した診断技術が要求され、また、穿刺吸引細胞診では、採取した細胞を培養する場合には鑑別までに数日間かかることや採取した細胞を観察することにより鑑別する場合には熟練を要する、等の問題がある。更に、穿刺吸引細胞診においては、濾胞腺癌と濾胞腺腫との鑑別が困難であるという問題もある。

【0004】

更に、甲状腺腫瘍の良性と悪性の違いについて腫瘍細胞表面の糖鎖をレクチンなどの糖認識タンパク質を用いて鑑別する方法が試みられ、良性甲状腺腫瘍と甲

状腺癌とで糖鎖が変化していることが判明するに至った。しかし、この方法は、採取した各細胞を標識糖鎖認識タンパク質と反応後、顕微鏡下でこの標識物の量を確認するというものであるため、検査に熟練を要するということや、定量的な評価をすることが難しい、等の問題がある。

【0005】

一方、良性腫瘍細胞及び悪性腫瘍細胞よりTgを夫々精製し、その糖鎖構造を解析した結果、良性腫瘍と悪性腫瘍とでは結合している糖鎖の構造が違っていることが明らかになっている。しかしこの方法でも、採取した細胞からTgを精製したり、その糖鎖構造を解析するために長時間かかるという問題がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような状況から、本発明が解決しようとする課題は、容易に且つ簡便に生体由来試料中の各種Tgを測定できる方法、この測定結果に基づき甲状腺腫瘍の悪性度を鑑別し得る方法並びに試薬の提供にある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、このような課題を解決するために成されたものであり、

(1) Tgの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するTgの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上用いることを特徴とする、Tgの測定方法、

(2) Tgの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するTgの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなる、Tg測定用試薬、

(3) 特定の糖鎖構造を有するTg量又はそれ以外の糖鎖構造を有するTg量に基づいて鑑別を行うことを特徴とする、甲状腺腫瘍の悪性度鑑別方法、

(4) Tgの不变領域に特異的に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するTgの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなる、甲状腺腫瘍の悪性度鑑別用試薬、
に関する。

【0008】

即ち、本発明者らは、上記した如き課題を解決するために銳意研究した結果、 T_g に特異的に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有する T_g の当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上用いることにより、生体試料中の T_g の総量、特定の糖鎖構造を有する T_g 量又は／及びそれ以外の糖鎖構造を有する T_g 量を測定し得ることを見出し、更に研究を重ねた結果、得られる、特定の糖鎖構造を有する T_g 量又はそれ以外の糖鎖構造を有する T_g 量、或いは全 T_g 中の特定の糖鎖構造を有する T_g 又はそれ以外の糖鎖構造を有する T_g の割合が、甲状腺腫瘍の悪性度鑑別に有用であることを見出し本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明に係る T_g の不变領域に結合するタンパク質（以下、「 T_g 結合タンパク質」と略記する。）としては、例えば T_g の不变領域に結合する抗 T_g 抗体、 T_g 結合レセプター等が挙げられる。また、これらは単独で用いても、適宜組み合わせて用いてもよい。尚、 T_g の不变領域とは、生体試料中の全ての T_g に共通な構造領域のことを指す。また、本発明に係る T_g 結合タンパク質は、 T_g の不变領域以外の領域にも結合する性質を有していてもよい。

【0010】

T_g 結合タンパク質には、特定の糖鎖構造を有する T_g の当該特定糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質（以下、「特定糖鎖結合タンパク質」と略記する。）が結合した T_g とは結合しない性質を有する T_g 結合タンパク質（以下、「競合性 T_g 結合タンパク質」と略記する。）や特定糖鎖結合タンパク質の結合の有無に拘わらず、全ての T_g と結合し得る性質を有する T_g 結合タンパク質（以下、「非競合性 T_g 結合タンパク質」と略記する。）等が含まれる。

【0011】

T_g の不变領域に結合する抗 T_g 抗体は、このような性質を有する抗体であれば、常法、例えば〔免疫実験学入門、第2刷、松橋直ら、（株）学会出版センター、1981〕等に記載の方法に従って、例えば馬、牛、羊、兔、山羊、ラット、マウス等の動物に測定対象を免役して作製されるポリクローナル性抗体でも、或い

はまた常法、即ちケラーとミルスタイン (Nature, 256巻, 495頁, 1975) により確立された細胞融合法に従って、例えばマウスの腫瘍ラインからの細胞と測定対象物で予め免役されたマウスの脾臓細胞を融合させて得られるハイブリドーマが産出する单クローン性抗体でもよい。

【0012】

本発明に係る特定糖鎖結合タンパク質としては、例えばTgの特定糖鎖構造に特異的に結合する抗体、レクチンなどが挙げられる。より具体的には、例えばルイス型糖鎖に反応する、例えば抗L^e^a抗体、抗L^e^b抗体、抗L^e^x抗体、抗L^e^y抗体、抗S-L^e^a抗体等の抗体類、例えばミヤコグサレクチン等のL-フコース結合性レクチン、例えばピーナッツレクチン、ダイズレクチン、ヒママメレクチン、インゲンマメレクチン等のD-ガラクトース-N-アセチル-D-グルコサミン結合性レクチン、例えばコンカナバリンA、レンズマメレクチン、エンドウマメレクチン等のD-マンノース結合性レクチン、例えば小麦胚芽レクチン、ダツラレクチン等のジ-N-アセチルキトビオース結合性レクチン、例えばカブトガニレクチン等のシアル酸結合性レクチン等のレクチン類が挙げられる。中でもD-ガラクトース-N-アセチル-D-グルコサミン結合性レクチン、D-マンノース結合性レクチン等が好ましい。また、これらは単独で用いても、適宜組み合わせて用いてもよい。

【0013】

尚、上記のレクチンの分類に於いて、結合性とは、適當な糖鎖を結合させたアフィニティーカラムに一旦結合させたレクチンがどのような糖で溶出され易いかを示すもので、例えばD-ガラクトース-N-アセチル-D-グルコサミン結合性レクチンとは、アフィニティーカラムに一旦結合させた後、D-ガラクトース若しくはN-アセチル-D-グルコサミンにより溶出されるレクチンのことを意味する。

【0014】

また、特定糖鎖構造に特異的に結合する抗体も、上記した如き常法に準じて調製されたポリクローン性抗体でも单クローン性抗体でもよい。

【0015】

本発明において、特定糖鎖構造とは、より具体的には、①上記した如きレクチンが結合し得る糖鎖構造、②例えば甲状腺腫瘍細胞等の腫瘍細胞が產生するTgが有する糖鎖構造、等であり、更に具体的には例えば Yamamoto, K., Eur. J. Biochem., vol. 143, 133-144, 1984等の文献に記載された如き糖鎖構造である。

【0016】

本発明の測定方法は、Tg結合タンパク質と特定糖鎖結合タンパク質とを適宜組み合わせて、例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料中の種々のTgを測定することを特徴とするものであり、その具体的な測定対象は、例えば総Tg、特定の糖鎖構造を有するTg、それ以外の糖鎖構造を有するTg等である。尚、Tgは、生体中で分解作用により、種々のフラグメントになるが、このようなものであってもTg結合タンパク質又は／及び特定糖鎖結合タンパク質が結合し得るものは、本発明の測定対象である。

【0017】

これら測定対象は、別々に測定してもよいし、一度の測定で同時に測定してもよい。

以下に測定方法の具体例を述べる。

【0018】

I. 測定対象を別々に測定する方法。

測定対象、即ち、例えば総Tg、特定の糖鎖構造を有するTg、それ以外の糖鎖構造を有するTg等は、夫々例えば以下のようにして測定される。

I-1. 総Tgの測定

Tg結合タンパク質を用いる自体公知の測定法により測定すればよい。

【0019】

I-2. 特定の糖鎖構造を有するTgの測定

I-2-1) Tg結合タンパク質固定化不溶性担体を用いる方法。

例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、Tg結合タンパク質固定化不溶性担体とを反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 — T g 結合タンパク質 — T g

次いで、不要な共存物質を洗浄等で除去した後、当該固定化複合体に、更に標識物質が結合した特定糖鎖結合タンパク質（以下、「標識特定糖鎖結合タンパク質」と略記する。）を反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 — T g 結合タンパク質 — T g — 標識特定糖鎖結合タンパク質

次いで、当該固定化複合体を洗浄する等して遊離の標識特定糖鎖結合タンパク質を除去した後、当該固定化複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の特定糖鎖構造を有する T g を含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）と T g 濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の特定糖鎖構造を有する T g 量を求めることができる。

【0020】

I - 2 - 2) 特定糖鎖結合タンパク質固定化不溶性担体を用いる方法。

例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、特定糖鎖結合タンパク質固定化不溶性担体とを反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 — 特定糖鎖結合タンパク質 — T g

次いで、不要な共存物質を洗浄等で除去した後、当該固定化複合体に、更に標識物質が結合した T g 結合タンパク質（以下、「標識 T g 結合タンパク質」と略記する。）を反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 — 特定糖鎖結合タンパク質 — T g — 標識 T g 結合タンパク質

次いで、当該固定化複合体を洗浄する等して遊離の標識Tg結合タンパク質を除去した後、当該固定化複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の特定糖鎖構造を有するTgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）とTg濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の特定糖鎖構造を有するTg量を求めることができる。

【0021】

I-2-3) 標識特定糖鎖結合タンパク質と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等とを用いる方法。

例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、標識特定糖鎖結合タンパク質と非競合性Tg結合タンパク質とを反応させて、試料中に下記の複合体を形成させる。

標識特定糖鎖結合タンパク質-Tg-非競合性Tg結合タンパク質

次いで、この複合体と遊離の標識特定糖鎖結合タンパク質とを、適当な充填剤を充填したHPLCや電気泳動法等を用いて分離し、該複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の特定糖鎖構造を有するTgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）とTg濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の特定糖鎖構造を有するTg量求めることができる。

【0022】

I-3. 特定の糖鎖構造以外の糖鎖構造を有するTgの測定

I-3-1) 遊離の特定糖鎖結合タンパク質を用いる方法

先ず、例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、特定糖鎖結合タンパク質とを反応させ、試料中の特定糖鎖構造を有するTgと特定糖鎖結合タンパク質との複合体（以下、「糖鎖結合Tg」と略記する場合がある。）を生成させる。次いで、糖鎖結合Tgと、特定糖鎖結合タンパク質が結合しなかったTg、言い換えれば、特定の糖鎖構造以外の糖鎖構造を有するTg（以下、「非結合Tg」と略記する場合がある。）とを、例えば、遠心分離法、ゲル濾過法、分子分画膜法、電気泳動法等の自体公知の分離方法を利用し

て試料から分離することにより非結合Tgのみを含む試料を調製する。

このようにして得られた、非結合Tgのみを含む試料中のTg量を、Tg結合タンパク質を用いる自体公知の測定法により測定することにより、非結合Tg量を求めることができる。

尚、非結合Tgのみを含有する試料は、特定糖鎖結合タンパク質を固定化した担体を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって試料を処理することにより調製してもよい。

【0023】

I-3-2) 競合性Tg結合タンパク質を用いる方法

先ず、Tg結合タンパク質を固定化した不溶性担体と、例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料とを反応させ、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 |—Tg結合タンパク質—Tg

次いで、不要な共存物質を洗浄等で除去した後、当該固定化複合体に特定糖鎖結合タンパク質を反応させ、更に適当な標識物質を結合させた競合性Tg結合タンパク質（以下、「標識競合性Tg結合タンパク質」と略記する。）を反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 |—Tg結合タンパク質—Tg—特定糖鎖結合タンパク質

| 不溶性担体 |—Tg結合タンパク質—Tg—標識競合性Tg結合タンパク質

次いで、当該固定化複合体を洗浄する等して遊離の標識競合性Tg結合タンパク質を除去した後、当該固定化複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の特定糖鎖構造以外の糖鎖構造を有するTg、即ち、非結合Tgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行つ

て得られた、標識物質量（測定値）と Tg 濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の非結合 Tg 量を求めることができる。

【0024】

I - 3 - 3) 競合性 Tg 結合タンパク質固定化不溶性担体を用いる方法。

先ず、例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、特定糖鎖結合タンパク質とを反応させ、試料中に糖鎖結合 Tg を生成させる。次いで、この試料と、競合性 Tg 結合タンパク質固定化不溶性担体とを反応させて下記の固定化複合体を生成させる。

| 不溶性担体 — 競合性 Tg 結合タンパク質 — 非結合 Tg

次いで、不要な共存物質を洗浄等で除去した後、当該固定化複合体に標識 Tg 結合タンパク質を反応させて、下記の固定化複合体を形成させる。

| 不溶性担体 — 競合性 Tg 結合タンパク質 — 非結合 Tg — 標識 Tg 結合タンパク質

次いで、当該固定化複合体を洗浄する等して遊離の標識 Tg 結合タンパク質を除去した後、当該固定化複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の非結合 Tg を含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）と Tg 濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の非結合 Tg 量を求めることができる。

【0025】

I - 3 - 4) 標識競合性 Tg 結合タンパク質と HPLC 等を用いる方法。

先ず、例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、特定糖鎖結合タンパク質とを反応させ、糖鎖結合 Tg を生成させる。次いで、この試料と、標識競合性 Tg 結合タンパク質とを反応させて下記の複合体を生成させる。

非結合 Tg — 標識競合性 Tg 結合タンパク質

次いで、この複合体と遊離の標識競合性Tg結合タンパク質とを、適当な充填剤を充填したHPLCや電気泳動法等を用いて分離し、該複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の非結合Tgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）とTg濃度との関係を表す検量線等に当てはめること等により、試料中の非結合Tg量を求めることができる。

尚、当然のことながら、特定糖鎖構造を有するTg（糖鎖結合Tg）量は、総Tg量から特定糖鎖構造以外の糖鎖構造を有するTg（非結合Tg）量を差し引くことによっても求めることができるし、特定糖鎖構造以外の糖鎖構造を有するTg（非結合Tg）量は、総Tg量から特定糖鎖構造を有するTg（糖鎖結合Tg）量を差し引くことによっても求めることができる。

【0026】

II. 測定対象を一度の測定操作で測定する方法。

II-1. 標識Tg結合タンパク質と特定糖鎖結合タンパク質を用いる方法

特開平7-191027号公報に開示された方法に準じて以下の如く行えばよい。

即ち、先ず、①例えば血漿、血清、髓液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、標識Tg結合タンパク質及び特定糖鎖結合タンパク質とを反応させるか、又は、②生体由来試料と、標識Tg結合タンパク質を反応させた後、当該反応液に更に特定糖鎖結合タンパク質を添加して反応させて、以下の複合体を形成させる。

標識Tg結合タンパク質-Tg

標識Tg結合タンパク質-Tg-特定糖鎖結合タンパク質

次いで、これら複合体並びに遊離の標識Tg結合タンパク質を、適当な充填剤を充填したHPLCや電気泳動法等を用いて夫々分離し、夫々の複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の、特定糖鎖構造を有するTg又は／及びそれ以外の糖鎖構造を有するTgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）と各種Tg濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中

の特定糖鎖構造を有する Tg 及びそれ以外の糖鎖構造を有する Tg、並びにこれら Tg の合計、即ち総 Tg を一度の測定で求めることができる。

尚、複合体並びに遊離の標識 Tg 結合タンパク質を分離する方法としては、操作性や繰り返し使用できること等を考慮すると HPLC を用いる方法が好ましい。

また、使用する Tg 結合タンパク質は、非競合性のものが好ましい。

【0027】

II-2. 非競合性 Tg 結合タンパク質、競合性タンパク質及び特定糖鎖結合タンパク質とを用いる方法

先ず、例えば血漿、血清、髓液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由来試料と、適当な標識物質が結合した非競合性 Tg 結合タンパク質（以下、「標識非競合性 Tg 結合タンパク質」と略記する。）、競合性タンパク質及び特定糖鎖結合タンパク質とを反応させて、以下の複合体を形成させる。

標識非競合 Tg 結合タンパク質-Tg-競合性 Tg 結合タンパク質

標識非競合 Tg 結合タンパク質-Tg-特定糖鎖結合タンパク質

次いで、これら複合体並びに遊離の標識非競合性 Tg 結合タンパク質を、適当な充填剤を充填した HPLC や電気泳動法等を用いて分離し、夫々の複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の、特定糖鎖構造を有する Tg 又は／及びそれ以外の糖鎖構造を有する Tg を含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質量（測定値）と各種 Tg 濃度との関係を表す検量線等に当てはめる等することにより、試料中の特定糖鎖構造を有する Tg 及びそれ以外の糖鎖構造を有する Tg、並びにこれら Tg の合計、即ち総 Tg を一度の測定で求めることができる。さらに、標識非競合 Tg 結合タンパク質とエピトープの違う非競合 Tg 結合タンパク質を同時に反応させることにより、複合体の性質を測定に影響する血清成分の性質との違いを大きくすることができ、血清成分の影響が少くなり、測定精度が向上するため好ましい。

尚、複合体並びに遊離の標識非競合性 Tg 結合タンパク質を分離する方法としては、操作性や繰り返し使用できること等を考慮すると HPLC を用いる方法が

好ましい。

【0028】

II-3. 標識Tg結合タンパク質と競合性Tg結合タンパク質を用いる方法

先ず、①例えば血漿、血清、髄液、各種生体組織の成分抽出液、尿等の生体由來試料と、標識Tg結合タンパク質を反応させた後、当該反応液にさらに特定糖鎖結合タンパク質及び競合性Tg結合タンパク質を反応させて、以下の複合体を形成させる。

標識Tg結合タンパク質-Tg-競合性Tg結合タンパク質

標識Tg結合タンパク質-Tg-特定糖鎖結合タンパク質

次いで、これら複合体並びに遊離の標識Tg結合タンパク質を、適当な充填剤を充填したHPLCや電気泳動法等を用いて夫々分離し、夫々の複合体中の標識物質量を適当な方法により測定し、得られた測定値を、例えば予め濃度既知の、特定糖鎖構造を有するTg又は／及びそれ以外の糖鎖構造を有するTgを含む標準液を用いて同様の方法により測定を行って得られた、標識物質の測定値と各種Tg濃度との関係を表す検量線等に当てはめることにより、試料中の特定糖鎖構造を有するTg及びそれ以外の糖鎖構造を有するTg、並びにこれらTgの合計、即ち総Tgを一度の測定で求めることができる。さらに標識Tg結合タンパク質の反応後に、標識Tg結合タンパク質とエピトープの違うTg結合タンパク質を反応させることにより、複合体の性質を測定に影響する血清成分の性質との違いを大きくすることができ、血清成分の影響が少なくなり、測定精度が向上するため好ましい。

尚、複合体並びに遊離の標識Tg結合タンパク質を分離する方法としては、操作性や繰り返し使用できること等を考慮するとHPLCを用いる方法が好ましい。

【0029】

Tg結合タンパク質を用いる自体公知のTg測定法は、例えばTg結合タンパク質として抗Tg抗体を用いて、いわゆる酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、HPLCを用いる測定方法(特開平9-301995号公報等)等の免疫学的測定

法に準じて行えばよい。また、その測定原理も、サンドイッチ法、競合法、二抗体法等のいずれにてもよい。

【0030】

種々のTg結合タンパク質や特定糖鎖結合タンパク質を固定化するために用いられる不溶性担体としては、上記した如き免疫学的測定法の分野で通常用いられるものでよく、例えば金属、ガラス、セラミック、シリコンラバー、例えばポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成高分子等で調製された、ビーズ、チューブ、多数のチューブが一体成形された専用のトレイ、マイクロタイタープレート等が挙げられ、固定化方法としても、上記した如き免疫学的測定法の分野で通常用いられる、例えば物理的吸着法、化学的結合法等が挙げられる。

【0031】

本発明に係るTg結合タンパク質や特定糖鎖結合タンパク質に結合させる標識物質としては、例えばEIAに於いて用いられるアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばRIAで用いられる ^{99m}Tc 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 等の放射性同位元素、例えばFIAで用いられるフルオレセイン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル)オキザレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-t-ブチル- α -(3,5-ジ-t-ブチル-4-オキソ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-p-トリルオキシル等のオキシル基を有する化合物に代表されるスピニラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられる。

【0032】

また、上記した如き標識物質を、Tg結合タンパク質や特定糖鎖結合タンパク

質に結合させる（標識する）方法としては、自体公知のEIA、RIA或はFIA等に於いて一般に行われている自体公知の標識方法に準じて行えばよい。また、標識方法として、アビジン（又はストレプトアビジン）とビオチンの反応を利用した常法を利用しても良い。

【0033】

本発明のHPLCを利用する測定法に於いて用いられるHPLC用装置も、通常この分野で用いられるものであればよい。

【0034】

本発明のHPLCを利用する測定法に於いては、複合体と遊離の標識Tg結合タンパク質（或いは標識特定糖鎖結合タンパク質）とをより明確に分離するために、例えば特開平7-191027号公報、特開平9-301995号公報等に開示された、これらの分離を向上させるための物質（以下、「分離向上物質」と略記する。）を結合させた、Tg結合タンパク質や特定糖鎖結合タンパク質等を用いてもよい。

【0035】

このような目的に用いられる分離向上物質としては、例えば α -キモトリプシノーゲン、 β -ガラクトシダーゼ、リゾチーム、チトクロームC、トリプシンインヒビター等のタンパク質、例えばフェニルアラニン、プロリン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸を含むペプチド、例えば臭素、塩素、沃素等のハロゲン原子、例えばポリエチレングリコール等の合成高分子、例えばポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリフェニルアラニン、ポリチロシン等のポリアミノ酸、炭素数3~10のアルキル鎖、例えばパルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸、例えばN-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド[N-(ϵ -maleimidocaproyloxy)succinimide] (EMCS), N-スクシンイミヂル-6-マレイミドヘキサノエイト (N-Succinimidyl-6-maleimidohexanoate), ビスマレイミドヘキサン (Bismaleimidohexane) (BMH), オクチルアミン等のTg結合タンパク質や特定糖鎖結合タンパク質に結合し得る反応基を有し且つ疎水性若しくはイオン性を有する化学物質、例えば特開平9-301995号公報に記載された4-(p-マレイミドフェニ

ル) ブチリルAla-(Tyr(SO₃H))₅、4-(p-マレイミドフェニル) ブチリルAla-(Tyr(SO₃H))₈等の強酸残基含有ペプチド等が好ましく挙げられる。尚、分離向上物質は、測定対象であるTg、Tg結合タンパク質、特定糖鎖結合タンパク質の性質(例えばpH安定性、疎水度、水溶液への溶解度、等電点等)を考慮した上で適宜選択して用いればよい。

【0036】

分離向上物質と、Tg結合タンパク質又は/及び特定糖鎖結合タンパク質との結合方法も、(1)自体公知のEIA、RIA或いはFIA等において一般に行われている自体公知の標識物質と抗体との結合方法(例えば、医学実験口座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、宮井潔編、第2版、医学書院、1982、等)、(2)自体公知の物質の修飾および結合方法(例えば、蛋白質の化学修飾〈上〉〈下〉、瓜谷郁三、志村憲助、中村道徳、船津勝編集、第1版、(株)学会出版センター、1981；ポリエチレングリコール修飾タンパク質、稻田祐二他、生化学、第62巻、第11号、P1351-1362、(社)日本生化学会、1990；DNA PROBES, George H.K. and Mark M.M. STOCKTON PRESS, 1989、等)等に準じて行えばよい。

【0037】

本発明の測定方法により得られた、総Tg、特定の糖鎖構造を有するTg、それ以外の糖鎖構造を有するTg等の値を適宜組み合わせることにより甲状腺腫瘍の悪性度を鑑別することが可能である。

【0038】

即ち、例えば総Tg中の特定の糖鎖構造を有するTg又はそれ以外の糖鎖構造を有するTgの割合を求めることにより、甲状腺腫瘍の悪性度、言い換えれば、その腫瘍が良性か悪性かを鑑別することができる。

【0039】

更に具体的に述べれば、例えば特定糖鎖結合タンパク質として、例えばピーナツツレクチン、ダイズレクチン、ヒママメレクチン、インゲンマメレクチン等のD-ガラクトース-N-アセチル-D-グルコサミン結合性レクチン、例えばコ

ンカナバリンA、レンズマメレクチン、エンドウマメレクチン等のD-マンノース結合性レクチン等を用いて、総Tg中の、特定の糖鎖構造を有するTg又はそれ以外の糖鎖構造を有するTgの割合を求めれば、その値に基づいて甲状腺乳頭癌と例えば良性甲状腺腫瘍、バセドウ病等との鑑別や、甲状腺滤胞癌と甲状腺滤胞腺腫との鑑別等が可能となる。

【0040】

即ち、本発明の甲状腺腫瘍の悪性度鑑別方法は、本発明者らが初めて見出したこれらの事実に基づいて成されたものである。

【0041】

本発明のTg測定用試薬は、Tgの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するTgの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなるものであり、その構成要素の好ましい態様と具体例は上で述べたとおりである。

【0042】

また、本発明の甲状腺腫瘍の悪性度鑑別用試薬は、Tgの不变領域に特異的に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するTgの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々1以上含有してなるものであり、その構成要素の好ましい態様と具体例は上で述べたとおりである。

【0043】

これら試薬中には、通常この分野で用いられる試薬類、例えば緩衝剤、反応促進剤、糖類、タンパク質、塩類、界面活性剤等の安定化剤、防腐剤等であって、共存する試薬等の安定性を阻害したり、Tgと、Tg結合タンパク質又は／及び特定糖鎖結合タンパク質との反応を阻害しないものが含まれていてもよい。また、その濃度も、通常この分野で通常用いられる濃度範囲から適宜選択すればよい。

【0044】

また、マグネシウム等の金属イオンがレクチン活性や安定性に影響を与えることはよく知られており、これらを含んでいてもよい。

【0045】

本発明の試薬に於いて用いることのできる緩衝剤としては、例えばトリス緩衝剤、リン酸緩衝剤、ベロナール緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッド緩衝剤等通常免疫比濁法、免疫比ろう法、RIA、EIAに用いられている緩衝剤は全て挙げられ、測定反応時のpHとしては抗原抗体反応やTgとレクチン等との反応を抑制しない範囲であれば特に限定されないが、通常6～10である。

【0046】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何等制限されるものではない。

【実施例】

【0047】

実施例1 コンカナバリンAレクチン(ConA)を用いた乳頭癌の鑑別方法

(パーオキシダーゼ標識抗Tg抗体)

抗Tg抗体（以下、「抗Tg-1」と略記する。）とパーオキシダーゼとを常法により結合させてパーオキシダーゼ標識抗Tg抗体（以下、「抗Tg-1・POD」略記する。）を調製した。

(試料)

ヒト甲状腺組織小片0.1g（湿重量）を0.1Mりん酸緩衝液(pH7.5、0.9%NaCl含有、以下「PBS」と略す)1ml中でガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、4℃、30000g、5分間遠心分離を行い、得られた上清を試料とした。

使用したヒト甲状腺組織は、乳頭癌11例、良性甲状腺腫5例、バセドウ病5例、正常5例であった。

(試液1)

ConA（株式会社ホーネンコーポレーション社製）をPBSに15mg/mLとなるように溶解したものを試液1とした。

(試料の前処理)

試料と試液1の各50μLを混合し、4℃で一晩インキュベーションを行い、4℃、3000g、20minで遠心分離し、沈殿物を除去し、得られた上清を前処理液1とした。尚、遠心分離処理により、ConAと結合したTgは除去される。

また試液1のかわりにPBSを用い、同様の方法で得た上清を前処理液2とした。

(Tg濃度の測定)

抗Tg-1とエピトープの違う抗Tg抗体（以下、「抗Tg-2」と略記する）を 5 μg 含むPBS 1 mlを 96 穴マイクロプレートの各ウエルに注入し、20℃で1時間放置した後PBSで洗浄して、抗Tg-2を固定化した。次いで、1%牛胎児血清含有 PBS 0.2mlをこのマイクロプレートの各ウエルに注入し、20℃で1時間放置した後PBSで洗浄して、ブロッキング処理を行った。1%牛胎児血清含有PBS 100 μL 、及び前処理液1または前処理液2の50 μL とを、このマイクロプレートのウエルに注入し、20℃で1時間反応させた。反応終了後、マイクロプレートの各ウエルをPBSで洗浄した後、10000倍に希釈した抗Tg-1・POD100 μL を注入し、20℃で1時間反応させた。反応終了後、PBSで洗浄後、3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard and Perry Labs Inc社製) 溶液100 μL 加え、20℃、30分反応させ、次いで1Mりん酸50 μL を加え反応を停止させた。各ウエルの450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー スペクトラ1（和光純薬工業（株）製）で測定し、得られた吸光度を、予め濃度既知のTg溶液を用いて同様の操作を行って得られたTg濃度と吸光度との関係を表す検量線に当てはめ、前処理液1及び2のTg濃度を算出した。

尚、前処理液1中のTg濃度は、ConA非結合性Tg量を表し、前処理液2中のTg濃度は、総Tg量を表す。

(ConA非結合性Tg割合の算出)

下記の式によりConA非結合性Tg割合 (%) を算出した。

$$\text{ConA非結合性Tg割合} (\%) = (\text{ConA非結合性Tg量}) / (\text{総Tg量}) \times 100$$

(結果)

測定したConA非結合性Tg割合 (%) を図1に示す。

図1から明らかな如く、乳頭癌組織抽出液では ConA非結合性Tg割合 (%) が、良性甲状腺腫組織抽出液、バセドウ病組織抽出液又は正常組織抽出液のそれに比べ有意に高いことが判る。また、良性甲状腺腫組織抽出液、バセドウ病組織抽出液及び正常組織抽出液間では、ConA非結合性Tg割合 (%) に差は認められないことも判る。即ち、乳頭癌組織では糖鎖の変化したTg、即ちConA非結合性Tgが増加すること、言い換えれば、ConA非結合性Tg割合 (%) は、良性甲状腺腫瘍

と乳頭癌の鑑別に非常に有用であることが判った。

【0048】

実施例2 ヒママメレクチン-120 (RCA120) を用いた乳頭癌の鑑別方法
(パーオキシダーゼ標識抗Tg抗体)

実施例1と同じ。

(試料)

実施例1の試料と同様にして調製した。尚、使用したヒト甲状腺組織は、乳頭癌7例、バセドウ病5例、及び正常4例であった。

(試液1)

RCA120 (株式会社ホーネンコーポレーション社製) をPBSに2.5mg/mLとなるよう溶解したものを試液1とした。

(試料の前処理)

実施例1の試料の前処理方法と同様にして、前処理液1及び2を調製した。

(Tg濃度の測定)

実施例1のTg濃度の測定方法と同様にして行った。

即ち、前処理液1中のTg濃度は、RCA120非結合性Tg量を表し、前処理液2中のTg濃度は、総Tg量を表す。

(RCA120非結合性Tg割合の算出)

下記の式によりRCA120非結合性Tg割合 (%) を算出した。

$$\text{RCA120非結合性Tg割合} (\%) = (\text{RCA120非結合性Tg量}) / (\text{総 Tg 量}) \times 100$$

(結果)

測定したRCA120非結合性Tg割合 (%) を図2に示す。

図2から明らかな如く、乳頭癌組織抽出液では RCA120非結合性Tg割合 (%) が、バセドウ病組織抽出液又は正常組織抽出液のそれに比べ有意に高いことが判る。即ち、乳頭癌組織では糖鎖の変化したTg、即ちRCA120非結合性Tgが増加すること、言い換えれば、RCA120非結合性Tg割合 (%) は、甲状腺腫瘍と乳頭癌の鑑別に有用であることが判った。

【0049】

実施例3 コンカナバリンAレクチン (ConA) を用いた滤胞癌と滤胞腺腫の鑑別

(パーオキシダーゼ標識抗Tg抗体の調製)

実施例1と同じ。

(試料)

実施例1の試料と同様にして調製した。尚、使用したヒト甲状腺組織は、濾胞癌4例、濾胞腺腫7例、及び正常5例であった。

(試液1)

実施例1と同じ。

(試料の前処理)

実施例1の試料の前処理方法と同様にして、前処理液1及び2を調製した。

(Tg濃度の測定)

実施例1のTg濃度の測定方法と同様にして行った。

即ち、前処理液1中のTg濃度は、ConA非結合性Tg量を表し、前処理液2中のTg濃度は、総Tg量を表す。

(ConA非結合性Tg割合の算出)

実施例1と同様にしてConA非結合性Tg割合(%)を算出した。

(結果)

測定したConA非結合性Tg割合(%)を図3に示す。

図3から明らかな如く、ConA非結合性Tg割合(%)は、正常組織抽出液、濾胞癌組織抽出液、濾胞腺腫組織抽出液の順に高くなり、濾胞癌組織抽出液中のそれと濾胞腺腫組織抽出液中のそれとでは有意に差があることが判る。即ち、この結果から、ConA非結合性Tg割合(%)を測定するにより、細胞診でも診断が難しい濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別を、簡単に行うことができる事が判った。

【0050】

実施例4 レンズマメレクチン(LCA)を用いた糖鎖構造の異なるTgの分別測定

(パーオキシダーゼ標識抗Tg抗体Fab'フラグメント)

LCAが結合したTgとは結合せず且つ認識するエピトープの異なる2種類の抗Tg抗体(以下、「抗Tg-86」と「抗Tg-78」と略記する。)を常法により処理してFab'フラグメントとし、これに常法によりパーオキシダーゼ(東洋紡社製)を結合させてパーオキシダーゼ標識抗Tg抗体Fab'フラグメント(以下、夫々「抗Tg-86

・Fab'-POD」及び「抗Tg-78・Fab'-POD」と略記する。)を調製した。

(抗体液1)

抗Tg-86・Fab-PODを2nM含有する50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl, 0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有)を調製し、抗体液1とした。

(抗体液2)

抗Tg-78・Fab-PODを3nM含有する50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl, 0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有)を調製し、抗体液2とした。

(試液1)

LCA(株式会社ホーネンコーポレーション社製)を15μM含有する50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl)調製し、試液1とした。

(試料)

ヒト甲状腺組織小片0.1g(湿重量)を0.1Mりん酸緩衝液(pH7.2、0.9%NaCl含有)1ml中でガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、4℃、100000g、60分間遠心して上清を得、これを更に50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl, 0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有)で200~1100倍に希釈したものを試料とした。

尚、使用したヒト甲状腺組織は、良性疾患4例(濾胞腺腫、腺腫様甲状腺腫2例、バセドウ病)、乳頭癌4例であった。

(測定方法)

試料25μLと試液1 15μLとを混合し、8℃で1時間反応させた。この反応液15μLに抗体液1 90μLを混合し、更に8℃で30分間反応させた。得られた反応液50μLを下記条件の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析し、LCA非結合性Tg量を求めた。同じ試料について、LCA含有の試液1の代わりに50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl, 0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有)を用いて同様に測定を行って、総Tg量を測定した。この2つの測定結果下記式に代入し、抗Tg-86・Fab-PODを用いた場合のLCA非結合性Tg割合(%)を算出した。

$$\text{LCA非結合性Tg割合(%)} = (\text{LCA非結合性Tg量}) / (\text{総Tg量}) \times 100$$

また、抗体液1の代わりに抗体液2を用いた以外は、同様に操作を行って、抗Tg-78・Fab'-PODを用いた場合のLCA非結合性Tg割合(%)の併せて算出した。

(HPLC条件)

カラム : Wakopack Wakosil-5Diol-200 8.0mm×300mm (w)

溶離液 : 50mMりん酸緩衝液 pH7.5、0.15M NaCl

基質液 : 15mMクエン酸緩衝液 (pH5.5 313mMアセトアミノフェノール
(同仁化学研究所(株)社製)、0.12%H2O2含有)

流速 : 溶離液 1.0min/mL、基質液 0.1 min/mL

検出 : Ex 328nm、Em 432nm

(結果)

抗Tg-86・Fab-POD及び抗Tg-78・Fab-PODを用いた場合のLCA非結合性Tg割合(%)を図4と図5に夫々示す。

図4及び図5から、良性疾患組織抽出液中のLCA非結合性Tg割合(%)に比較して、乳頭癌組織抽出液中のそれは有意に高いことが判る。

即ち、LCAを用いることにより、良性疾患と乳頭癌の鑑別診断が可能となることが判る。

【0051】

実施例5 ConAを用いた糖鎖構造の異なるTg (Tg) の分別測定

(パーオキシダーゼ標識抗Tg抗体Fab'フラグメント)

実施例4で調製した抗Tg-86・Fab'-PODを使用した。

(抗体液1)

抗Tg-86・Fab-PODを4nM含有する50mMりん酸緩衝液(pH7.5、0.15M NaCl, 0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有)を調製し、抗体液1とした。

(試液1)

ConA(株式会社ホーネンコーポレーション社製)を15μM含有する50mMりん酸緩衝液pH7.5、0.15M NaClを調製し、試液1とした。

(試料)

実施例4と同じものを用いた。

(測定方法)

試料10μLと試液1 45μLとを混合した後、8°Cで1時間反応させた。この反応液に抗体液1 45μLを加え、更に8°Cで1時間反応させた。得られた反応液50μL

を下記条件の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析し、ConA非結合性Tg量を求めた。同じ試料について、試液1の代わりに50mMりん酸緩衝液（pH7.5、0.15M NaCl、0.5(w/v)%牛血清アルブミン含有）を用いて同様に測定を行って、総Tg量を測定した。この2つの測定結果下記式に代入し、ConA非結合性Tg割合（%）を算出した。

$$\text{ConA非結合性Tg割合(%)} = (\text{ConA非結合性Tg量}) / (\text{総Tg量}) \times 100$$

(HPLC条件)

実施例4と同じ。

(結果)

得られたConA非結合性Tg割合（%）を図6に示す。

図6から、良性疾患組織抽出液中のConA非結合性Tg割合（%）に比較して、乳頭癌組織抽出液中のそれは有意に高いことが判る。

即ち、ConAを用いることにより、良性疾患と乳頭癌の鑑別診断が可能となることが判る。

【0052】

【発明の効果】

本発明は、簡便且つ高精度に各種生体由来試料中の各種Tgを測定し得る測定方法並びにその為の試薬を提供するものであり、本発明の測定方法により得られた各種Tgの測定値を適宜組み合わせて用いることにより、甲状腺乳頭癌と良性甲状腺腫瘍との鑑別や甲状腺濾胞癌と甲状腺濾胞腺腫との鑑別をすることができる。

【0053】

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1で得られた、各種甲状腺組織抽出液中のコンカナバリン（ConA）非結合性サイログロブリン（Tg）割合（%）を示す。

【図2】

実施例2で得られた、各種甲状腺組織抽出液中のヒママメレクチン-120(RCA-120)非結合性Tg割合（%）を示す。

【図3】

実施例3で得られた、各種甲状腺組織抽出液中のコンカナバリン(ConA)非結合性サイログロブリン(Tg)割合(%)を示す。

【図4】

実施例4で得られた、抗Tg抗体として抗Tg-86を用いた場合の、各種甲状腺組織抽出液中のレンズマメレクチン(LCA)非結合性サイログロブリン(Tg)割合(%)を示す。

【図5】

実施例4で得られた、抗Tg抗体として抗Tg-78を用いた場合の、各種甲状腺組織抽出液中のレンズマメレクチン(LCA)非結合性サイログロブリン(Tg)割合(%)を示す。

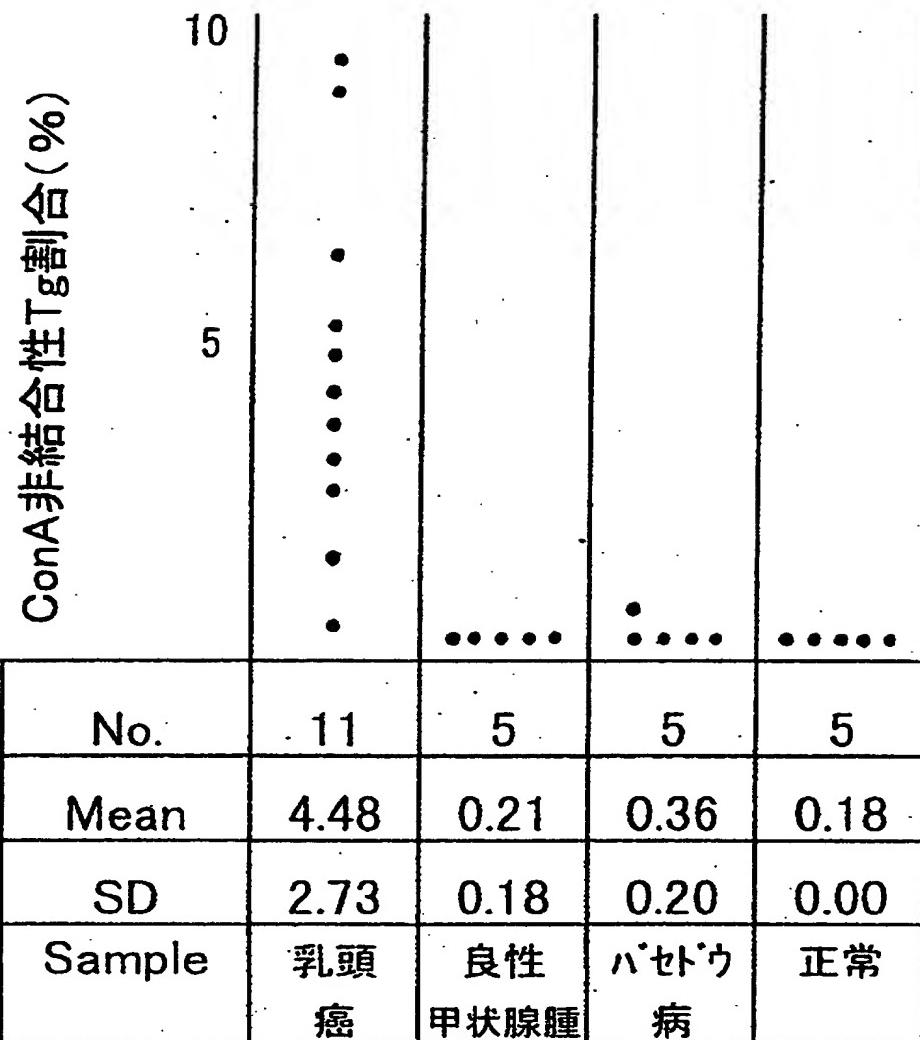
【図6】

実施例5で得られた、各種甲状腺組織抽出液中のコンカナバリン(ConA)非結合性サイログロブリン(Tg)割合(%)を示す。

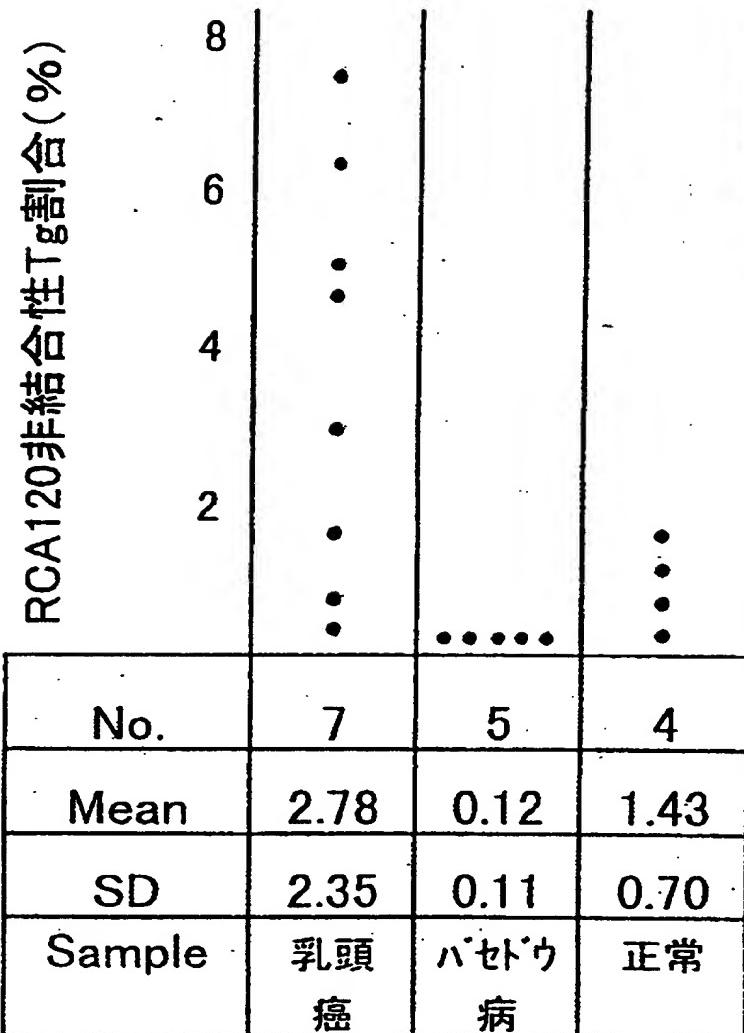
【書類名】

図面

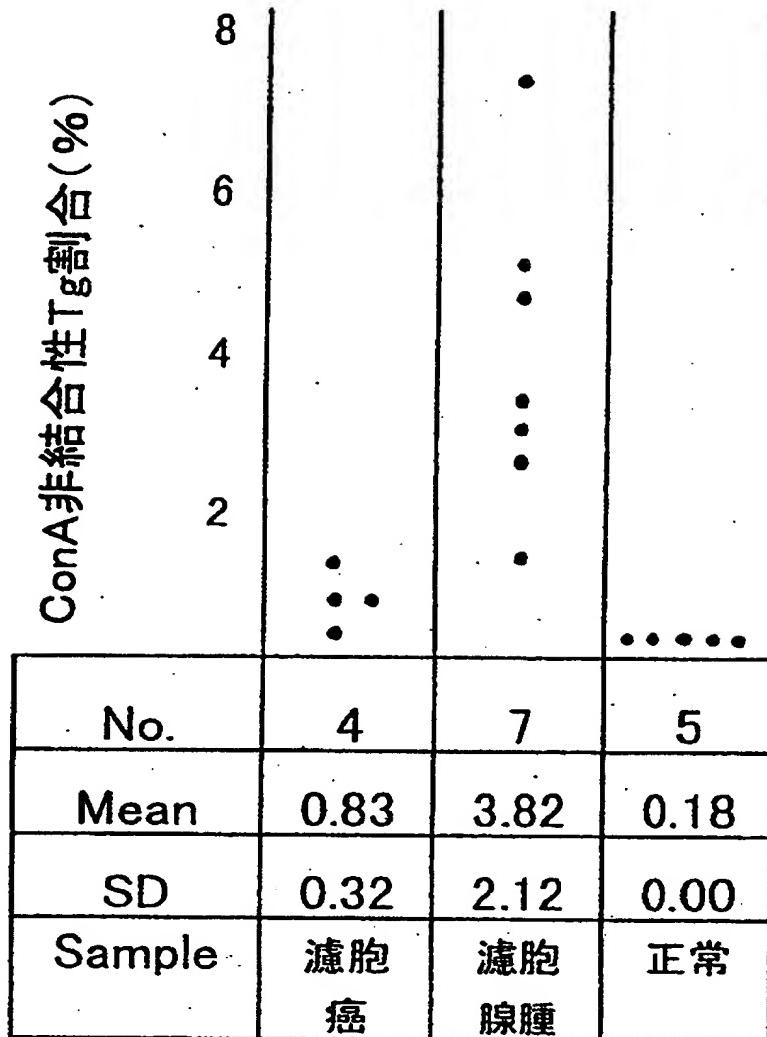
【図1】



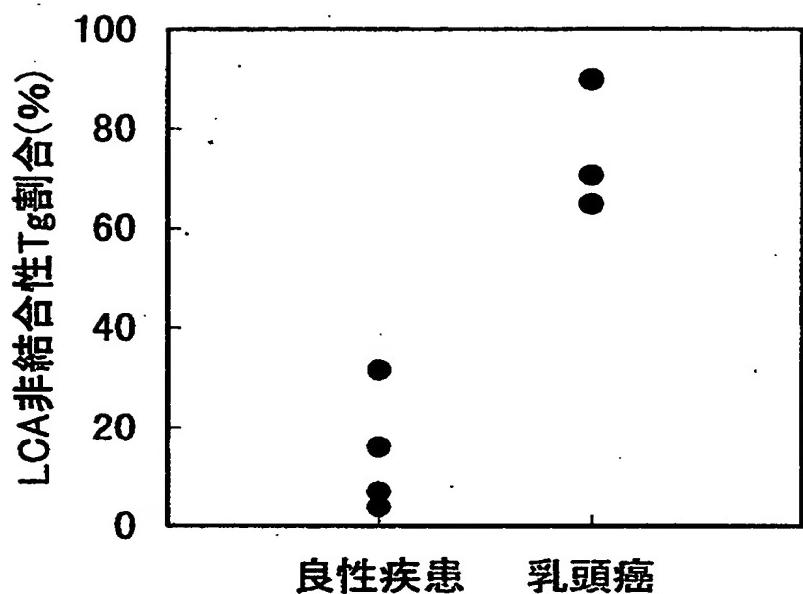
【図2】



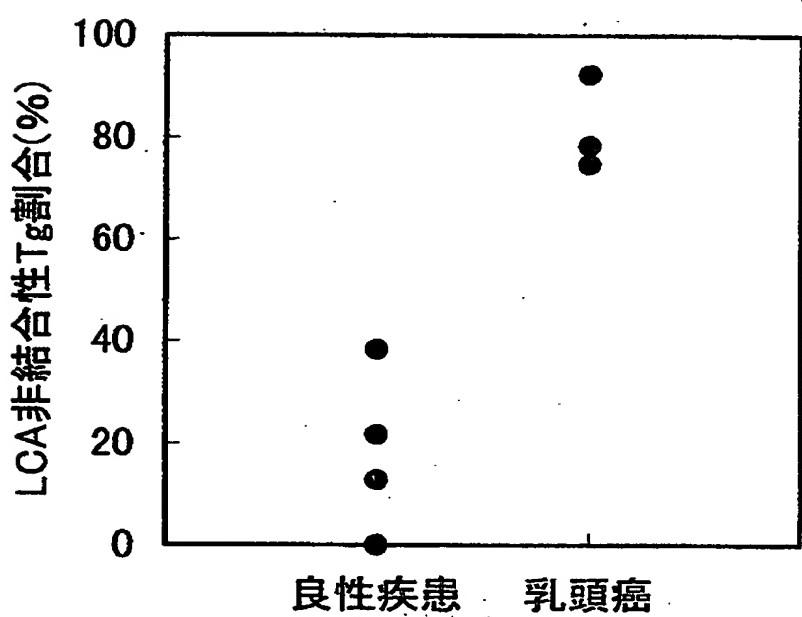
【図3】



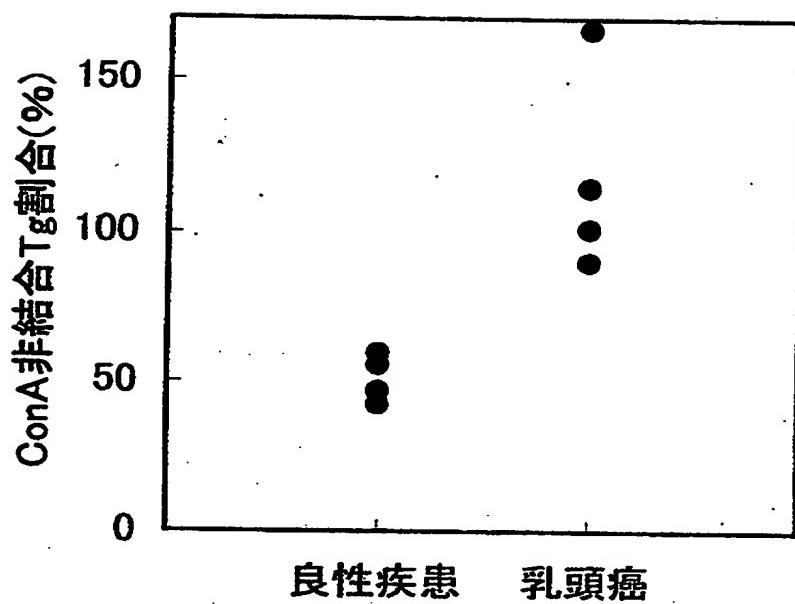
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 容易に且つ簡便に生体由来試料中の各種 T_g を測定できる方法、この測定結果に基づき甲状腺腫瘍の悪性度を鑑別し得る方法並びに試薬の提供。

【解決手段】 サイログロブリンの不变領域に結合するタンパク質と、特定の糖鎖構造を有するサイログロブリンの当該糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質を、夫々 1 以上用いることを特徴とする、サイログロブリンの測定方法、この測定結果に基づき甲状腺腫瘍の悪性度を鑑別し得る方法並びに試薬。

【選択図】 図 1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人 000252300
【識別番号】
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
【氏名又は名称】 和光純薬工業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [000252300]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

氏 名 和光純薬工業株式会社